

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18048

## 基于核酸适配体的 PCR 法检测溶藻弧菌及其灭活菌

汤学敏<sup>1,2</sup>, 林文燕<sup>1</sup>, 鄢庆枇<sup>1</sup>, 刘慧敏<sup>1</sup>, 彭英林<sup>1</sup>, 赵铨<sup>1</sup>, 林旭俊<sup>3</sup>, 郑江<sup>1</sup>

1. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;
2. 广东雅琪生物科技股份有限公司, 广东 广州 510000;
3. 厦门阳嘉环保科技有限公司, 福建 厦门 361021

**摘要:** 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)分布广, 数量多, 发病率高, 是水产养殖中常见的条件致病菌, 而对溶藻弧菌进行快速准确的识别鉴定是其病害防治的前提和基础。核酸适配体, 因为具有较高的亲和和特异性, 在微生物的识别鉴定方面展现出了巨大的优势。本文利用核酸适配体和适配体筛选产物, 通过结合、洗涤、加热分离、PCR 扩增以及电泳检测等步骤, 对溶藻弧菌进行了检测鉴定。结果表明, 适配体和筛选产物都能对溶藻弧菌及其灭活菌进行较好的识别鉴定, 适配体筛选产物对溶藻弧菌的检测下限为  $10^3$  cfu/mL, 而对其灭活菌的检测下限为  $10^2$  cfu/mL, 适配体对溶藻弧菌及其灭活菌的检测下限都可达到 10 cfu/mL。该方法对溶藻弧菌有较好的亲和和特异性, 并能较好地地区分溶藻弧菌与哈维氏弧菌等水产常见病原菌, 在水产病害的检测中显示了较好的应用前景。

**关键词:** 核酸适配体; 溶藻弧菌; PCR; 灭活; 检测

中图分类号: S947; Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0391-06

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一种条件致病菌, 其数量居海洋弧菌之首, 是弧菌中危害最大的病原菌之一<sup>[1-3]</sup>。它主要通过食物和水传播, 是一种人和水生动物共患病原菌<sup>[4]</sup>。它不仅对水产养殖业造成巨大的经济损失, 对公共安全也构成了严重的威胁<sup>[5-6]</sup>。近年来由溶藻弧菌引起的人类腹泻和食物中毒屡见报道, 因此, 世界各国食品卫生法规中均将溶藻弧菌列入法定检测项目<sup>[7-8]</sup>。然而, 由于弧菌种类多、变异快、基因相似度也很高, 不同弧菌引发的早期临床症状非常相似, 因此, 传统的一些检测方法对溶藻弧菌的检测鉴定效果并不理想<sup>[9-10]</sup>。

适配体是利用 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 技术, 即指数富

集配体的系统进化技术, 筛选出的对靶目标具有较高亲和和特异性的寡核苷酸分子<sup>[11-13]</sup>。其识别能力达到、甚至超过了抗体的识别水平, 而制备技术则比抗体简单、快速<sup>[14-15]</sup>。因此, 有关适配体的应用检测研究目前已有不少报道。但不少检测方法都是先对寡核苷酸适配体进行标记后, 再对相关标记进行检测<sup>[16-17]</sup>。由于标记基团的引入会导致核酸适配体空间结构的改变, 因此其检测效果受相关标记的影响较大, 同时, 对核酸适配体进行标记也大大增加了检测成本, 使其应用受到限制。

本文研究建立了一种基于核酸适配体的无需标记的检测技术, 该技术将适配体的高亲和和特异性与 PCR 的高灵敏性相结合, 通过适配体的特异

收稿日期: 2018-6-17; 修订日期: 2018-07-20.

基金项目: 国家海洋经济发展区域示范项目(14PYY050SF03); 福建省自然科学基金项目(2018J01455); 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金项目(RE201808); 大学生创新创业训练计划项目(201710390021, 201810390073, 2018lxj025, 2018lxj058, 2018lxj066, 2018lxj067).

作者简介: 汤学敏(1989-), 女, 硕士, 从事微生物及微生态制剂方面的研究. E-mail: esta\_tang@163.com

通信作者: 郑江, 博士, 教授, 从事水产病原微生物等方面的研究. E-mail: zhengjiang618@163.com

结合锁定靶目标,再利用 PCR 技术对适配体进行扩增,放大适配体的识别信号,最后通过电泳来检测这些放大的信号,从而实现对靶目标——溶藻弧菌的快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及其灭活处理

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)由集美大学病原生物实验室提供。

灭活菌的制备:取活菌菌液于离心管中,6000 r/min 离心 5 min,弃上清,再加入含 6%甲醛的生理盐水于 62.5℃水浴 1 h,离心后生理盐水洗涤 3 次,再用 2×结合缓冲液(pH 7.4,含 0.1 mol/L NaCl,5 mmol/L KCl,50 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>)悬浮菌沉淀,然后将灭活菌稀释至相应浓度备用。

### 1.2 适配体及其筛选产物和引物

适配体筛选产物是前期以灭活溶藻弧菌为靶目标,经过 15 轮 SELEX 筛选获得的 PCR 产物,它是多种核酸适配体的混合物,其中的适配体长度为 66~107 个单链寡核苷酸序列<sup>[18]</sup>。本研究采用的核酸适配体是对上述适配体筛选产物进行克隆测序和验证后获得的一条寡核苷酸序列(82nt)<sup>[18]</sup>,其序列为:5'-TCAGTCGCTTCGCCGTCTCCTTCTGCAGGGCCAGAACAGGGGGAAGGCACAAGAGGGAGCACAAGAGGGAGACCCCAGAGGG-3',两端带下划线的是与引物结合的固定序列。

引物 P1:5'-TCAGTCGCTTCGCCGTCTCCTTC-3'

引物 P2:5'-CCCTCTGGGGTCTCCCTCTGTGC-3'

适配体和引物序列均由上海生工生物公司合成。PCR 中的 DreamTaq DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司,dNTP 购自 Generay Biotech 公司,DNA marker 购自天根生化科技有限公司,琼脂糖购自厦门太阳马生物工程有限公司。

### 1.3 适配体或适配体筛选产物对水体中溶藻弧菌的识别检测

结合:取浓度为 10 μmol/L 适配体 5 μL 或取

适配体筛选产物 5 μL,用 2×结合缓冲液稀释至 100 μL,95℃变性 5 min,冰浴 10 min 后,分别加入待测样品 100 μL 或不同浓度的菌悬液 100 μL 中,于转速 100 r/min 摇床中结合 30 min。同时做一空白,即用 5 μL ddH<sub>2</sub>O 代替适配体,重复上述过程。

洗涤:结合完毕以后,6000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀部分为菌沉淀及其结合的适配体,然后洗涤菌沉淀 6 次。每次洗涤,菌沉淀加入 1×结合缓冲液 500 μL,充分混匀后,将菌悬液转移到新的离心管中,以除去与管壁有亲和力的适配体,然后离心、弃上清、取菌沉淀。

分离:沉淀中加入 1×结合缓冲液 100 μL,95℃加热 5 min,使那些与菌结合的适配体变性,空间结构改变,从而与弧菌分离,然后 15000 r/min 离心 10 min,取上清液,则可分离到能与菌结合的适配体,然后每管 20 μL 分装至 200 μL 的 PCR 管中,保存在-20℃备用。

PCR 扩增:以分离出的上清液(内含与菌结合的适配体)为模版,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为:总体积 25 μL,其中模板 2 μL,DreamTaq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,引物 P1(10 μmol/L)1 μL,引物 P2(10 μmol/L)1 μL,dNTP(10 mmol/L)0.4 μL,10×PCR 缓冲液 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 补充体积至 25 μL。PCR 扩增条件为:94℃预变性 4 min,然后进行 35 个循环(94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 20 s),最后 72℃延伸 7 min。

电泳检测:取 PCR 产物 5 μL,用 2.5%琼脂糖电泳进行检测拍照。

### 1.4 适配体对鱼血清中溶藻弧菌的识别检测

感染实验:将溶藻弧菌接种于 TSB 液体培养基中,于 30℃下 100 r/min 摇床培养 6~8 h 后,用无菌生理盐水洗涤 2 次后重悬,测定菌浓度,再用无菌生理盐水将菌浓度稀释为 5.0×10<sup>6</sup> cfu/mL。设计 2 个平行实验组和 1 个阴性对照组,选择 250 g 左右的罗非鱼为实验用鱼(购于集美菜市场),每组 2 尾鱼,进行人工感染。对实验组每尾鱼静脉注射 0.1 mL 的溶藻弧菌的菌悬液,给对照组每尾鱼注射 0.1 mL 无菌生理盐水,连续饲养 2 d。

取血: 分别选取被溶藻弧菌感染的鱼和未感染的鱼进行取血。先用 1% 肝素钠浸润注射器和离心管, 然后用无菌注射器抽取鱼血 2 mL, 离心后, 吸取血清备用。

结合: 取浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  适配体 5  $\mu\text{L}$ , 用 2 $\times$ 结合缓冲液稀释至 100  $\mu\text{L}$ , 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 冰浴 10 min 后, 分别加入浓度  $10^3$  cfu/mL 的灭活菌悬液(阳性对照)、未感染的血清(阴性对照或空白)和被感染的待测血清各 100  $\mu\text{L}$ , 于转速 100 r/min 摇床结合 30 min。

后续按照与 1.3 相同的方法进行洗涤、分离、PCR 扩增和电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 适配体筛选产物对水体中溶藻弧菌的识别检测

利用适配体筛选产物分别对活菌与灭活菌, 混合菌与单一菌的样品进行了检测, 结果发现, 对于嗜水气单胞菌、哈唯氏弧菌和迟钝爱德华菌, 不管是活菌还是灭活菌, 检测电泳图中均未显现出较明亮的条带(如图 1 的泳道 1~6), 说明适配体筛选产物对这三种菌的亲合力都较低。对于灭活的溶藻弧菌, 适配体筛选产物可检测出  $10^2$  cfu/mL、 $10^3$  cfu/mL 的浓度(如图 1 的泳道 8、9), 但浓度为  $10^3$  cfu/mL 的检测效果较好; 而对于正常培养的活的溶藻弧菌, 适配体筛选产物可检测出  $10^3$  cfu/mL 的浓度(如图 1 的泳道 12), 说明适配体筛选产物不仅对灭活的溶藻弧菌有较好的亲和特异性, 对活的溶藻弧菌也有一定的识别作用。对于混合菌样品, 适配体筛选产物的识别效果与前面的也类似, 对灭活溶藻弧菌可检测出  $10^2$  cfu/mL、 $10^3$  cfu/mL 的浓度(如图 1 的泳道 15、16), 但对菌浓度在  $10^3$  cfu/mL 以上的识别效果较好, 这表明即使有其他杂菌的干扰, 适配体筛选产物对灭活溶藻弧菌依然有较好的识别效果。

### 2.2 适配体对水体中溶藻弧菌的识别检测

对于水体中的溶藻弧菌, 不论是灭活菌还是活菌, 适配体最低都能检测到 10 cfu/mL、 $10^2$  cfu/mL (如图 2 中的泳道 5、6、8、9), 但在浓度  $10^2$  cfu/mL 以上的电泳条带明显较为明亮(如图 2 的泳道 6、7、

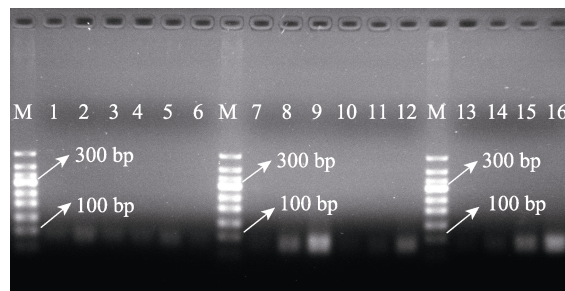


图 1 适配体筛选产物对溶藻弧菌的检测

M: marker; 1、2、3: 适配体筛选产物对三种灭活菌(嗜水气单胞菌、哈唯氏弧菌和迟钝爱德华菌)的检测结果; 4、5、6: 适配体筛选产物对三种活菌(嗜水气单胞菌、哈唯氏弧菌和迟钝爱德华菌)的检测结果, 三种菌的浓度依次为  $1.7 \times 10^4$  cfu/mL、 $6.6 \times 10^3$  cfu/mL、 $1.3 \times 10^4$  cfu/mL; 7、8、9: 适配体筛选产物对三个浓度梯度( $10$  cfu/mL、 $10^2$  cfu/mL、 $10^3$  cfu/mL)的灭活溶藻弧菌的检测结果; 10、11、12: 适配体筛选产物对三个浓度梯度( $10$  cfu/mL、 $10^2$  cfu/mL、 $10^3$  cfu/mL)的活的溶藻弧菌的检测结果; 13~16: 适配体筛选产物对灭活混合菌(溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、哈唯氏弧菌和迟钝爱德华菌的混合菌液)中的溶藻弧菌的检测结果, 混合菌中灭活溶藻弧菌的浓度依次为 0 cfu/mL、10 cfu/mL、 $10^2$  cfu/mL 和  $10^3$  cfu/mL, 其他 3 种菌浓度均为  $10^4$  cfu/mL。

Fig. 1 Detection of *Vibrio alginolyticus* by the SELEX product  
M: marker; 1, 2, 3: the detections of  $1.7 \times 10^4$  cfu/mL inactivated *A. hydrophila*,  $6.6 \times 10^3$  cfu/mL inactivated *V. harveryi*, and  $1.3 \times 10^4$  cfu/mL inactivated *E. tarda* respectively; 4, 5, 6: the detections of  $1.7 \times 10^4$  cfu/mL live *A. hydrophila*,  $6.6 \times 10^3$  cfu/mL live *V. harveryi*, and  $1.3 \times 10^4$  cfu/mL live *E. tarda* respectively; 7, 8, 9: the detections of inactivated *V. alginolyticus* at the concentration of 10 cfu/mL,  $10^2$  cfu/mL,  $10^3$  cfu/mL respectively; 10, 11, 12: the detections of live *V. alginolyticus* at the concentration of 10 cfu/mL,  $10^2$  cfu/mL,  $10^3$  cfu/mL respectively; 13–16: the detections of the inactivated *V. alginolyticus* at the concentration of 0 cfu/mL, 10 cfu/mL,  $10^2$  cfu/mL,  $10^3$  cfu/mL in the mixed bacterial suspension and other three bacterial concentration was  $10^4$  cfu/mL each.

9、10), 检测效果更好; 而该适配体对其他三种灭活菌(嗜水气单胞菌、迟钝爱德华菌、哈维氏弧菌)的电泳条带的亮度都较弱(如图 2 的泳道 2、3、4), 其中灭活哈维氏弧菌的电泳条带有一定的亮度(图 2 的泳道 4), 亮度其次的为灭活的迟钝爱德华氏菌(图 2 的泳道 3), 而嗜水气单胞菌的电泳条带几乎没有亮度(图 2 的泳道 2), 说明该适配体对灭活的哈维氏弧菌和迟钝爱德华氏菌有一定的交叉反应, 但比较而言, 这些电泳条带的亮度都明显弱于溶藻弧菌, 表明该适配体对溶藻弧菌有较好的亲和特异性和识别效果。与前面筛选产物相比, 单一适配体的检测灵敏度提高了一个数量级。

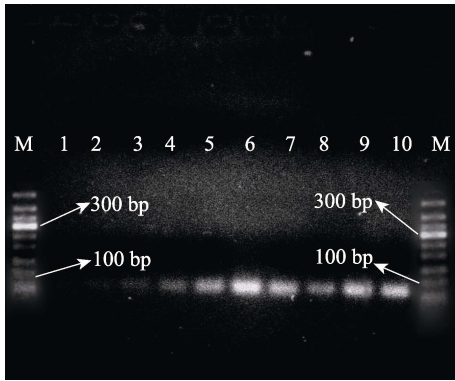


图 2 适配体对溶藻弧菌的检测

M: marker; 1: 空白, 即适配体对 ddH<sub>2</sub>O 的检测结果; 2、3、4: 适配体对三种灭活菌(嗜水气单胞菌、迟钝爱德华菌和哈唯氏弧菌)的检测, 三种菌的浓度依次为  $1.7 \times 10^4$  cfu/mL、 $1.3 \times 10^4$  cfu/mL、 $6.6 \times 10^3$  cfu/mL; 5、6、7: 适配体对菌浓度为 10 cfu/mL、 $10^2$  cfu/mL、 $10^3$  cfu/mL 的灭活溶藻弧菌的检测; 8、9、10: 适配体对浓度为 10 cfu/mL、 $10^2$  cfu/mL、 $10^3$  cfu/mL 的活的溶藻弧菌的检测。

Fig. 2 Detection of *Vibrio alginolyticus* by aptamer

M: marker; 1: blank, the detection of ddH<sub>2</sub>O; 2, 3, 4: the detections of  $1.7 \times 10^4$  cfu/mL inactivated *A. hydrophila*,  $1.3 \times 10^4$  cfu/mL inactivated *E. tarda* and  $6.6 \times 10^3$  cfu/mL inactivated *V. alginolyticus* respectively; 5, 6, 7: the detections of inactivated *V. alginolyticus* at the concentration of 10 cfu/mL,  $10^2$  cfu/mL,  $10^3$  cfu/mL respectively; 8, 9, 10: the detections of live *V. alginolyticus* at the concentration of 10 cfu/mL,  $10^2$  cfu/mL,  $10^3$  cfu/mL respectively.

### 2.3 适配体对血清中溶藻弧菌的识别检测

以未感染的鱼血清为阴性对照, 以灭活溶藻弧菌作为阳性对照, 检测鱼血清中的溶藻弧菌, 结果显示, 阴性对照的电泳条带亮度较弱(图 3 的泳道 B), 含有  $10^3$  cfu/mL 的灭活溶藻弧菌的阳性对照有较明亮的电泳条带(图 3 的泳道 93), 感染溶藻弧菌的血清也有较明亮的电泳条带, 其亮度与阳性对照的灭活溶藻弧菌的亮度相近(图 3 的泳道 9), 且明显比阴性对照的电泳条带亮, 说明该适配体对血清中的溶藻弧菌也能较好地识别检测, 而对血清中其他物质的亲和力较弱, 即血清本底对检测结果的影响不大。

## 3 讨论

有关核酸适配体在弧菌检测中的应用研究已有一些报道。Duan 等<sup>[19-20]</sup>利用双适配体构建的传感器, 最低能检测出 14 cfu/mL 的副溶血弧菌; 而将适配体与纳米颗粒相结合, 则可同时检测副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌, 并且最低能检测出

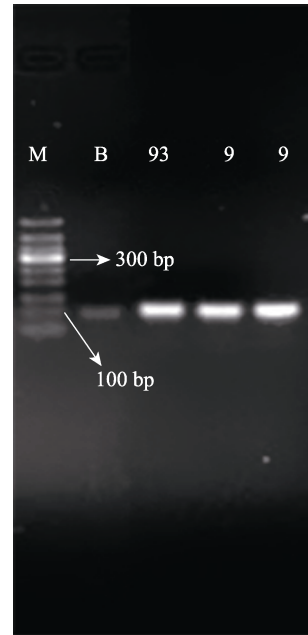


图 3 适配体对血清中溶藻弧菌的检测

M: marker; B: 阴性对照; 93: 适配体对浓度为  $10^3$  cfu/mL 的阳性对照菌——灭活溶藻弧菌的检测; 9: 适配体对血清中溶藻弧菌的 2 个平行检测结果。

Fig. 3 Detection of *Vibrio alginolyticus* in serum by aptamer

M: marker; B: negative control; 93: the detection of  $10^3$  cfu/mL inactivated *V. alginolyticus* (positive control); 9: the detections of *V. alginolyticus* in serum.

25 cfu/mL 的副溶血弧菌。Zhao 等<sup>[21]</sup>的研究则表明, 将适配体与纳米磁珠、膜电极相结合, 最低可以检测到 10 cfu/mL 的溶藻弧菌。本研究则表明, 将适配体与 PCR 相结合, 最低也可检出 10 cfu/mL 的溶藻弧菌。

溶藻弧菌是一种人和水生动物共患病原菌, 对其进行灭活处理后再进行检测, 能有效降低人感染的风险。不过目前的检测, 主要还是针对活菌, 其中最常用的就是传统的微生物培养法。该方法通过检测微生物在生长过程中产生的代谢物来实现对溶藻弧菌的检测。目前绝大部分的市售试剂盒就是采用这种方法。不过对于溶藻弧菌而言, 微生物培养法的灵敏度较低, 无法检出浓度低于  $10^3$  cfu/mL 的溶藻弧菌, 对不同种类弧菌的区分度也较差, 而且该方法只对活菌有效, 对灭活菌无效。另有一些方法是利用溶藻弧菌的特殊基因, 通过 PCR 扩增技术, 可以检测出最低为  $10^2$  cfu/mL 数量级的溶藻弧菌<sup>[22-23]</sup>。本研究结果

则显示, 将核酸适配体与 PCR 技术相结合, 最低可检出 10 cfu/mL 的溶藻弧菌, 对 10<sup>2</sup> cfu/mL 以上的溶藻弧菌则有较好的检测效果。而且该方法对溶藻弧菌的活菌和灭活菌都同样有效, 并能有效区分溶藻弧菌和哈维氏弧菌等水产常见病原菌, 展现出了较好的亲和特异性及应用前景。

非特异性结合是分析检测中经常碰到的问题。在本研究中也发现, 核酸适配体与灭活哈维氏弧菌、灭活迟钝爱德华氏菌以及鱼血清等非靶目标之间都有一定的交叉反应, 存在少量较弱的非特异性结合, 不过这种非特异性结合的亲和力较弱, 可以通过增加洗涤次数和洗涤液用量等方法来降低其影响。本研究结果表明, 洗涤 6 次后, 这些非特异性结合明显减少, 相应电泳条带的亮度要显著弱于溶藻弧菌的目标实验组, 说明本研究采用的这种基于适配体的 PCR 法能够较好地实现对溶藻弧菌的检测。

适配体筛选产物, 是经过多轮 SELEX 筛选获得的 PCR 产物, 它是多种适配体的混合物, 含有多种对靶目标有较好亲和特异性的适配体。采用适配体筛选产物来检测目标菌, 不仅可以省去筛选后期的一些步骤, 如克隆测序、亲和特异性验证等步骤, 还可以降低采用单一适配体进行检测的成本。从本研究的检测效果看, 采用适配体筛选产物进行检测, 虽然比单一适配体的检测灵敏度有所降低, 但仍然比传统微生物培养法的灵敏度要高。因此, 对于灵敏度要求不太高的一些检测项目, 用适配体筛选产物来进行检测也不失为一种较为经济的备选方案。

#### 参考文献:

- [1] Badreddine M, Abir M, Amel M, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of highly pathogenic *Vibrio alginolyticus* strains isolated during mortality outbreaks in cultured *Ruditapes decussatus* juvenile[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 111(3): 487-496.
- [2] Ye J, Ma Y, Liu Q, et al. Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system[J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(3): 161-169.
- [3] Zhao J J, Chen C, Luo P, et al. SYBR Green I-based real-time PCR targeting the rpoX gene for sensitive and rapid detection of *Vibrio alginolyticus*[J]. Molecular and Cellular Probes, 2011, 25(2-3): 137-141.
- [4] Hormansdorfer S, Wentges H, Neugebauer-Buchler K, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2000, 203(2): 169-175.
- [5] Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(3-4): 310-317.
- [6] Schärer K, Savioz S, Cernela N, et al. Occurrence of *Vibrio* spp. in fish and shellfish collected from the Swiss market[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(8): 1345-1347.
- [7] Schets F M, van den Berg H H J L, Marchese A, et al. Potentially human pathogenic vibrios in marine and fresh bathing waters related to environmental conditions and disease outcome[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2011, 214(5): 399-406.
- [8] Liu Y, Kong F D, Xu S F, et al. Development and preliminary application of dual PCR assay for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(8): 647-650. [刘阳, 孔繁德, 徐淑菲, 等. 副溶血弧菌和溶藻弧菌双重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(8): 647-650.]
- [9] Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson F L. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(21): 7932-7936.
- [10] Wei S, Zhao H, Xian Y Y, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2014, 79(2): 115-118.
- [11] Li Y N, Zhao J, Zhang A Z, et al. Recent progress in in vitro screening of aptamers[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(4): 78-82. [李亚楠, 赵洁, 张傲哲, 等. 核酸适配体的体外筛选方法的最新研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(4): 78-82.]
- [12] Kang K N, Lee Y S. RNA aptamers: a review of recent trends and applications[M]// Future Trends in Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2012, 131: 153-169.
- [13] Ding F, Gao Y G, He X R. Recent progresses in biomedical applications of aptamer-functionalized systems[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(18): 4256-4269.
- [14] Kim Y S, Hyun C J, Kim I A, et al. Isolation and characterization of enantioselective DNA aptamers for ibuprofen[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010, 18(10): 3467-3473.
- [15] Wang L, Ye H, Sang H Q, et al. Determination of isocarbofos and profenofos B by fluorescent spectrophotometry based on aptamer[J]. Chinese Journal of Analytic Chemistry,

- 2016, 44(5): 799-803. [王丽, 叶华, 桑宏庆, 等. 基于核酸适配体的荧光法检测水胺硫磷和丙溴磷[J]. 分析化学, 2016, 44(5): 799-803.]
- [16] Wang L, Wang M K, Shi F P, et al. Aptamer based fluorescence biosensor for protein kinase activity detection and inhibitor screening[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 252: 209-214.
- [17] Bayraç C, Eyidoğan F, Avni Öktem H. DNA aptamer-based colorimetric detection platform for *Salmonella enteritidis* [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 98: 22-28.
- [18] Tang X M, Zheng J, Yan Q P, et al. Selection of aptamers against inactive *Vibrio alginolyticus* and application in a qualitative detection assay[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(6): 909-914.
- [19] Duan N, Shen M F, Wu S J, et al. Graphene oxide wrapped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanostructures as substrates for aptamer-based detection of *Vibrio parahaemolyticus* by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(8): 2653-2660.
- [20] Duan N, Wu S J, Dai S L, et al. Simultaneous detection of pathogenic bacteria using an aptamer based biosensor and dual fluorescence resonance energy transfer from quantum dots to carbon nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(5-6): 917-923.
- [21] Zhao G T, Ding J W, Yu H, et al. Potentiometric aptasensing of *Vibrio alginolyticus* based on DNA nanostructure- modified magnetic beads[J]. *Sensors*, 2016, 16(12): 2052.
- [22] Xu Y G, Sun L M, Wang Y S, et al. Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay[J]. *Food Control*, 2017, 71: 64-70.
- [23] Xie Z Y, Pang X H, Zhou Y C, et al. Establishment of a method for detection of *Vibrio alginolyticus* virulent strains based on a new gene[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(6): 342-346. [谢珍玉, 庞兴红, 周永灿, 等. 基于一种新基因的溶藻弧菌毒力菌株检测方法的建立[J]. 水产科学, 2011, 30(6): 342-346.]

## Detection of *Vibrio alginolyticus* and its inactivated form based on aptamers and polymerase chain reaction

TANG Xuemin<sup>1,2</sup>, LIN Wenyan<sup>1</sup>, YAN Qinpi<sup>1</sup>, LIU Huimin<sup>1</sup>, PENG Yinglin<sup>1</sup>, ZHAO Quan<sup>1</sup>, LIN Xujun<sup>3</sup>, ZHENG Jiang<sup>1</sup>

1. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education; Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Fishery, Resources and Eco-environment, Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Guangdong Atech Biotechnology Limited Corporation, Guangzhou 510000, China;
3. Xiamen Yangjia Environmental Science and Technology Limited Company, Xiamen 361021, China

**Abstract:** *Vibrio alginolyticus* is a common conditional pathogen in aquaculture, which is widely distributed in the world. Rapid detection of the pathogen is necessary for the prevention and control of the diseases caused by the bacterium. Aptamers exhibit great advantages in the detection of microorganisms owing to their high affinities and specificities. In the present study, *Vibrio alginolyticus* was detected based on its aptamer and its selection products following various steps, such as binding, washing, separation, amplification, and electrophoresis. The results showed that the aptamer and the selection products could superiorly detect *V. alginolyticus* and its inactivated form. The lowest detection limits were 10 cfu/mL of *V. alginolyticus* or its inactivated form by the aptamer, and 10<sup>2</sup> cfu/mL of inactivated *V. alginolyticus* and 10<sup>3</sup> cfu/mL of *V. alginolyticus* by the selection products. The system of detection had better affinity and specificity for *V. alginolyticus* and could distinguish *V. alginolyticus* from other aquatic pathogens such as *V. harveyi*, and therefore shows good application potential in the detection of pathogens in aquaculture.

**Key words:** aptamer; *Vibrio alginolyticus*; polymerase chain reaction; inactivation; detection

**Corresponding author:** ZHENG Jiang. E-mail: zhengjiang618@163.com